拟南芥 bHLH Ib 转录因子调控 *FIT* 的转录

杨钰洁[1,2]，梁岗[1*]

（1. 中国科学院西双版纳热带植物园热带植物资源可持续利用重点实验室， 昆明 650223；

2. 中国科学院大学生命科学学院，北京 100049）

摘要：FIT 是调控拟南芥铁稳态的一个关键调控因子，它在转录水平受到缺铁诱导，但是背后的调控机制还不甚清楚。该研究以拟南芥 *bHLH38* 和 *FIT* 的单、双过表达植物及 bHLH Ib 四突变体为研究材料，进行了缺铁处理实验，并通过定量 PCR 分析了 *FIT* 的转录水平。结果表明：（1）在铁充足时，*bHLH38* 过表达植物中 *FIT* 的转录水平显著高于其在野生型中水平；（2）在 bHLH Ib 四突变体里 *FIT* 的转录水平不受缺铁诱导；（3）*FIT* 单过表达不能激活内源 *FIT* 的转录，但 *bHLH38* 和 *FIT* 的双过表达则可以激活内源 *FIT* 的转录；（4）在缺铁条件下，所有植物中 *FIT* 的转录水平均与野生型中的 *FIT* 水平无明显差异。基于以上结果，该研究认为 bHLH Ib 转录因子是缺铁诱导 *FIT* 转录的必要条件，而非充分条件。

关键词：铁，转录调控，缺铁响应，铁稳态

中图分类号：　　　　**文献标识码**：A　　　　文章编号：

bHLH Ib transcription factors regulate the transcription of *FIT* in *Arabidopsis thaliana*

YANG Yujie[1,2] , LIANG Gang[1*]

(1. *Key Laboratory of Tropical Plant Resources and Sustainable Use*, *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *Chinese Academy of Sciences*, Kunming, 650223, China; 2. *College of Life Sciences*, *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract：FIT (FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR) is a key regulator of Fe homeostasis, which is up-regulated under Fe deficiency conditions, however,

收稿日期：2022-09-20

基金项目：云南省应用基础研究计划项目（2019FB028；202001AT070131） [Supported by Applied Basic Research Project of Yunnan Province]。

作者简介：杨钰洁(1995-)，硕士研究生，主要从事植物铁营养代谢研究，（E-mail) 870417073@qq.com。

*通信作者：梁岗，博士，研究员，植物矿质营养，（E-mail) lianggang@xtbg.ac.cn。

the underlying mechanism is still unclear. In this study, the transcript levels of *FIT* was determined in the single and dual overexpression plants for *bHLH38* and *FIT*, as well as the bHLH Ib quadruple mutant. Under Fe sufficient conditions, *FIT* increased in the *bHLH38* overexpression plants compared with in the wild type plants. The transcription of *FIT* did not respond to Fe deficiency in the bHLH Ib quadruple mutant. The overexpression of *FIT* could not activate the transcription of native *FIT*, and the dual overexpression of *FIT* and *bHLH38* promoted the transcription of native *FIT* under Fe sufficient conditions. There was no difference for the expression of *FIT* between the transgenic or mutant plants and wild type plants under Fe deficiency conditions. Taken together, these data suggest that bHLH Ib transcription factors are necessary, but not sufficient, for the upregulation of *FIT* by Fe deficiency.

Keywords: Iron, transcription regulation, Fe deficiency response, Fe homeostasis

铁是植物生长发育的重要微量元素之一，它作为多种酶的辅助因子参与植物的光合作用、呼吸作用、叶绿素的生物合成、植物固氮以及植物激素合成等重要生命过程（Hänsch & Mendel, 2009; Balk & Schaedler, 2014）。铁是地壳中的第四大元素，但由于其易氧化形成沉淀，不易被植物利用；在 pH 较高的土壤中，铁的利用率更低（Guerinot & Yi, 1994）。缺铁常常导致缺铁症状，如叶片脉间失绿黄化。植物是人类获取铁的重要膳食来源，因此植物缺铁也会进一步影响人类健康。

为了从土壤中获取足够的铁，植物已经进化了两种不同的吸收策略，即非禾本科植物的策略 I 和禾本科植物的策略 II（Marschner & Romheld, 1986; Romheld & Marschner, 1986; Grillet & Schmidt, 2019）。模式植物拟南芥采用的策略 I 包括土壤酸化、Fe^{3+}还原为 Fe^{2+}和铁吸收三个步骤。拟南芥的根际土壤酸化主要由 AHA2 完成（Santi & Schmidt, 2009），之后 Fe^{3+}被 FRO2（FERRIC REDUCTION OXIDASE 2）还原为 Fe^{2+}（Robinson et al., 1999），最后由 IRT1（IRON-REGULATED TRANSPORTER 1）转运进根细胞（Varotto et al., 2002; Vert et al., 2002）。禾本科植物，如大麦（*Hordeum vulgare*），玉米（*Zea mays*）和水稻（*Oryza sativa*）可以分泌高亲和力的麦根酸（也被称为植物铁载体）来直接螯合 Fe^{3+}（Walker & Connolly, 2008; Morrissey & Guerinot, 2009）。最近的研究表明拟南芥也能分泌铁螯合物（Rodriguez-Celma & Schmidt, 2013; Fourcroy et al., 2014; Schmid et al., 2014; Siwinska et al., 2018; Tsai et al., 2018）。

FIT 是策略 I 机制中的一个关键的调节因子，其功能丧失会导致 *IRT1* 和 *FRO2* 表达水平的降低和严重的缺铁症状（Vert et al., 2002; Colangelo & Guerinot, 2004; Jakoby et al., 2004;

Yuan et al., 2005）。FIT 与 bHLH Ib 亚家族的四个成员（bHLH38、bHLH39，bHLH100 和 bHLH101）相互作用调控缺铁响应（Yuan et al., 2008; Wang et al., 2013）。这四个基因都受到缺铁条件的诱导，而且它们的蛋白功能冗余（Wang et al., 2013）。

FIT 也是多种植物激素信号和细胞内信号与缺铁信号联系的中心枢纽。例如，FIT 蛋白的稳定性受到乙烯和一氧化氮（NO）的调节（Garcia et al., 2010; Lingam et al., 2011; Meiseret al., 2011）。乙烯信号通路中的转录因子 EIN3（ETHYLENE INSENSITIVE）和 EIL1（ETHYLENE INSENSITIVE 3-LIKE1）与 FIT 互作，并增强其稳定性（Lingam et al., 2011）。NO 能抑制 FIT 蛋白降解，促进其在缺铁条件下的稳定（Meiser et al., 2011）。此外，NO 通过 GRF11（GENERAL REGULATORY FACTOR 11）调节 *FIT* 转录（Yang et al., 2013）。赤霉素是缺铁反应的另一个正调控因子。最近的研究表明，DELLA 蛋白作为赤霉素信号通路的负调控因子，与 FIT 蛋白相互作用并抑制 FIT 蛋白功能（Wild et al., 2016）。另外，茉莉酸通过诱导 bHLH IVa 亚家族基因（*bHLH18*，*bHLH19*，*bHLH20* 和 *bHLH25*）的表达负调控缺铁反应，其产物与 FIT 相互作用并促进 FIT 的降解（Matsuoka et al., 2014; Cui et al., 2018）。作为缺铁响应信号中的关键转录因子，*FIT* 的转录也受到缺铁诱导。我们近来的研究表明 bHLH121 直接靶向 *FIT* 的启动子，并且正调控后者转录（Lei et al., 2020）。

作为铁稳态信号中的一个关键调控因子，*FIT* 自身的转录也受到缺铁条件的诱导。已有研究表明，FIT 和 bHLH Ib 可以影响 *FIT* 的转录（Wang et al., 2007; Naranjo-Arcos et al., 2017），但是它们是如何调控 *FIT* 表达的还不甚清楚。该研究重点关注 bHLH Ib 成员 bHLH38 及 FIT 转录因子对 *FIT* 转录水平的调控。探讨 *bHLH38* 过表达是否可以激活 *FIT* 的转录？在 bHLH Ib 的四突变里 *FIT* 转录是否再受缺铁诱导？*FIT* 过表达能否激活内源 *FIT* 的转录？*bHLH38* 和 *FIT* 的双过表达如何影响 *FIT* 的表达。

1 材料和方法

1.1 植物材料和生长条件

本研究中所用的拟南芥为 Columbia-0 生态型。播种前将种子用 70%酒精浸泡 15 分钟，之后用蒸馏水清洗至少三次。将种子铺在培养基上，4 ℃冷藏两天后移到温室进行培养（22 ℃，光照 16 h/黑暗 8 h）。+Fe 培养基：即 1/2MS 培养基（1%蔗糖、0.7%琼脂 A、0.1 mM Fe-EDTA、pH 5.8）+Fe 培养基：其培养基成分除了不加 Fe（II）-EDTA 外与上面提及的+Fe 培养基一样。论文中所用的 *FIT* 过表达植物来自于中科院遗传发育研究所凌宏清研究组（Cui et al., 2018）。

1.2 载体构建及转基因

我们提取了野生型拟南芥根部的 RNA，反转录成 cDNA，通过 PCR 获得了 bHLH38 的全长编码区序列，然后将其克隆到 pOCA30 双元表达载体上。载体用来转化农杆菌 EHA105，然后利用浸花法转化野生型拟南芥。T1 代转基因种子在 1/2MS+50 mg/L 卡那霉素的平板上进行筛选阳性苗。

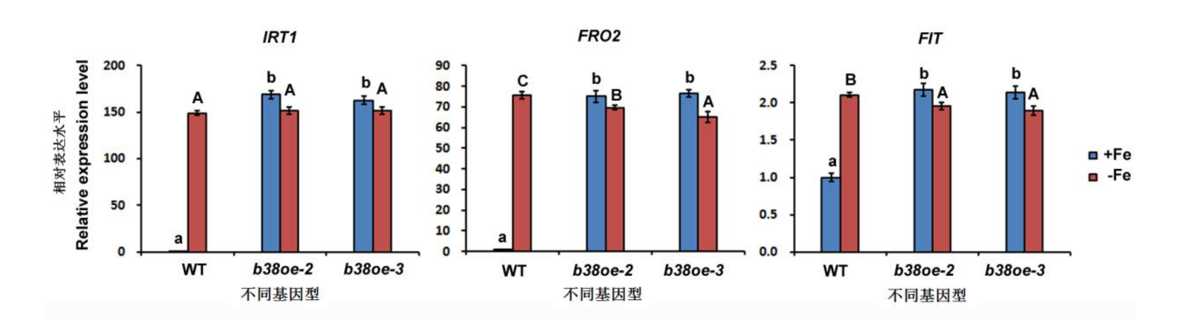
1.3 定量 RT-PCR 分析

将在+Fe（0.1 mM Fe(II)-EDTA）垂直板上生长 7 天的幼苗，分别移到+Fe 和-Fe 垂直板上生长 3 天，然后分离根用液氮冻存。利用 Trizol 试剂盒提取根部的总 RNA，然后用反转录试剂盒（TaKaRa）的 oligo（dT）$_{18}$ 引物反转成 cDNA。使用 SYBR Premix Ex Taq^{TM} kit（TaKaRa）定量 PCR 试剂盒在 Roche Light Cycler 480 real-time PCR 仪器上进行定量检测，其中 *ACT2* 用作内参基因。

2 结果与分析

2.1 *bHLH38* 过表达促进了 *FIT* 在+Fe 条件下的表达

我们选择 *bHLH38* 作为 bHLH Ib 转录因子的代表开展研究。*IRT1* 和 *FRO2* 是 FIT 和 bHLH Ib 转录因子的靶基因，受到缺铁条件的诱导。在我们的实验里，*IRT1* 和 *FRO2* 被用作阳性 Marker 基因。我们用定量 PCR 检测了缺铁响应基因 *IRT1*，*FRO2* 和 *FIT* 的表达。结果表明，在+Fe 情况下 *IRT1*，*FRO2* 和 *FIT* 在 *bHLH38* 过表达植物中的表达水平显著高于它们在 WT 中的水平；但在-Fe 情况下，它们在 *bHLH38* 过表达植物中的表达则类似于或略低于其在 WT 中的水平（图 1）。



数据为三次生物重复的平均值。小写字母表示+Fe 条件下的显著差异，大写字母表示-Fe 条件下显著差异（ANOVA, P < 0.01）。下同。

Data represent means ± SD (n = 3). Different letters (uppercase letters for –Fe; lowercase letters for +Fe) above each bar indicate statistically significant differences (ANOVA, P < 0.01). The same below.

图 1 *IRT1*、*FRO*2 和 *FIT* 在 *bHLH38* 过表达植物中的表达情况

Fig. 1 Expression of *IRT1*, *FRO2* and *FIT* in the *bHLH38* overexpression plants

2.2 四突变体植物的 *FIT* 转录水平不受-Fe 诱导

接下来，我们对 bHLH Ib 的四突变体 *bhlh4x-1* 和 *bhlh4x-2* 进行了缺铁处理（Cai et al., 2021），并通过定量 PCR 检测了 *IRT1*，*FRO2* 和 *FIT* 的表达。结果表明，在+Fe 情况下，*IRT1* 和 *FRO2* 在 *bhlh4x-1* 和 *bhlh4x-2* 中的表达水平显著低于它们在 WT 中的水平，而 *FIT* 的表达水平没有明显变化。相比较，-Fe 情况下，*IRT1*，*FRO2* 和 *FIT* 在 *bhlh4x-1* 和 *bhlh4x-2* 中的表达水平全部显著低于它们在 WT 中的水平（图 2）。

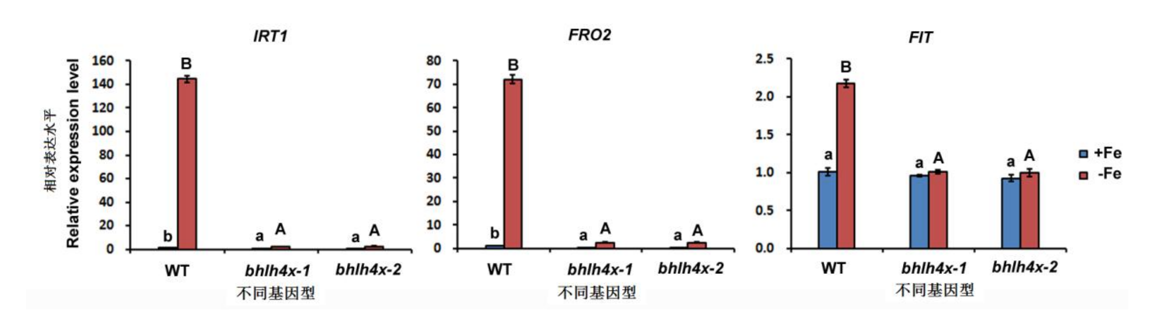


图 2 *IRT1*、*FRO*2 和 *FIT* 在四突变植物中的表达情况

Fig. 2 Expression of *IRT1*, *FRO2* and *FIT* in the *bhlh4x* mutants

2.3 外源 *FIT* 过表达不能激活内源 *FIT* 的转录

我们对 *FIT* 过表达植物进行了缺铁处理并利用定量 PCR 检测了 *IRT1*，*FRO2* 和以及内源 *FIT* 的表达（图 3）。我们用跨 *FIT* 基因最后一个外显子与 3'UTR 的一个片段来定量内源 *FIT* 的表达。结果表明，无论在+Fe 情况下还是在-Fe 情况下，*IRT1* 和 *FRO2* 的表达水平在 *FIT* 过表达植物中轻微上调，而内源 *FIT* 的表达水平在 *FIT* 过表达植物和 WT 植物中没有显著差异。

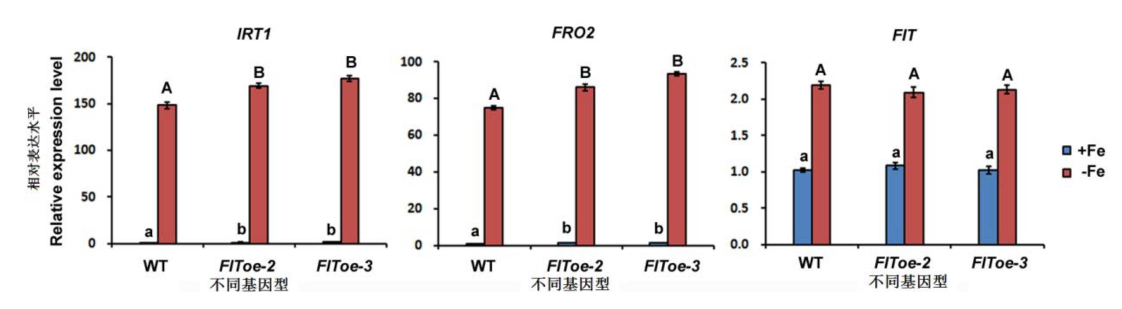


图 3 *IRT1*、*FRO*2 和 *FIT* 在 *FIT* 过表达植物中的表达情况

Fig. 3 Expression of *IRT1*, *FRO2* and native *FIT* in the *FIT* overexpression plants

2.4 在+Fe 条件下 *bHLH38* 和 *FIT* 的双过表达促进了内源 *FIT* 的增加

我们分别对 *bHLH38* 和 *FIT* 的双过表达植物进行了缺铁处理，然后通过定量 PCR 检测

了 *IRT1*，*FRO2* 以及内源 *FIT* 的转录变化。结果表明，在+Fe 和-Fe 条件下，双过表达植物中 *IRT1* 和 *FRO2* 的表达水平都高于 WT 中的表达水平。相比较，双过表达植物的内源 *FIT* 水平只在+Fe 时高于 WT，但在-Fe 时与 WT 的水平相近（图 4）。

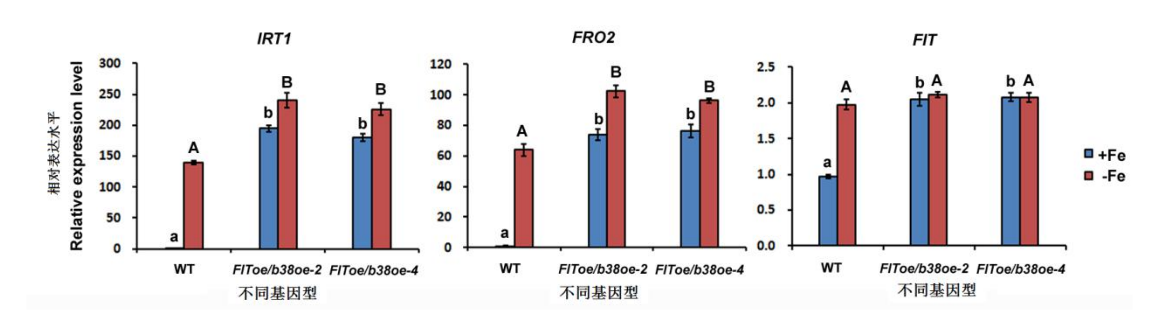


图 4 *IRT1*、*FRO2* 和 *FIT* 在双过表达植物中的表达情况

Fig. 4 Expression of *IRT1*, *FRO2* and native *FIT* in the dual overexpression plants

3 讨论与结论

铁是植物生长发育所必需的一种矿质元素，而铁的可利用性主要依赖于土壤的 pH 值。在酸性土壤中部分铁以离子形式存在被植物利用，但是在碱性土壤中铁主要以不溶的氧化状态存在。由于植物固着生长，无法移动，因此在碱性土壤中生长的植物不得不面对缺铁胁迫。经过长期的进化，植物已经进化了一些特殊的机制来适应缺铁环境。植物能感知铁浓度的变化，并通过一套严密的铁信号转导系统来激活下游铁吸收相关基因的表达以促进铁的吸收。在拟南芥的缺铁响应系统中，FIT 是一个处于核心位置的转录因子，它直接控制了铁吸收基因 *IRT1* 和 *FRO2* 的表达（Schwarz & Bauer, 2020）。但是，*FIT* 自身的转录也受到缺铁的诱导（Colangelo & Guerinot, 2004）。探究 *FIT* 在缺铁条件下如何被激活已成为铁信号研究领域的一个热点。

过表达 bHLH Ib 亚家族的成员 bHLH39 可以在+Fe 情况下激活 *FIT* 表达（Naranjo-Arcos et al., 2017），表明 bHLH39 在+Fe 条件下正调控 *FIT* 的表达。我们分析了 bHLH Ib 中另一个成员 *bHLH38* 的过表达植物，发现 *FIT* 的表达趋势类似于其在 *bHLH39* 过表达植物的情况，这也再次证明了 bHLH Ib 家族成员之间的功能冗余性。由于较强的功能冗余性，bHLH Ib 四个成员的单、双突变体没有明显的缺铁表型，三突变体则表型出轻微的缺铁表型（Sivitz et al., 2012; Wang et al., 2013; Maurer et al., 2014），而四突变体则表现出强烈的缺铁症状（Cai et al., 2021）。该研究发现四突变体中 *FIT* 的表达水平在+Fe 时没有显著变化，但在-Fe 时显著低于其 WT 中的水平，这表明 bHLH Ib 对于-Fe 时 *FIT* 的上调是必需的。

fit 突变体中 *FIT* 的启动子活性显著低于 WT 中的水平（Wang et al., 2007），表明 FIT 对

于其自身的转录是必需的。我们的结果表明在 *FIT* 过表达植物里，内源 *FIT* 的表达与 WT 没有显著差异，这表明外源 *FIT* 过表达并不足以促进内源 *FIT* 的转录。因此，FIT 对于 *FIT* 自身转录是必要条件，但不是充分条件。在铁稳态信号转导途径中，FIT 通过与 bHLH Ib 成员形成异源二聚体共同激活下游基因 *IRT1* 和 *FRO2* 的表达（Yuan et al., 2018; Wang et al., 2013）。在 WT 背景下过表达 *bHLH39* 可以促进 *IRT1* 和 *FRO2* 的表达，但在 *fit* 突变体背景下 bHLH39 却不能激活靶基因 *IRT1* 和 *FRO2*（Naranjo-Arcos et al., 2017），这说明 bHLH39 激活 *IRT1* 和 *FRO2* 的转录需要 FIT 的参与。在+Fe 情况下，*bHLH38* 过表达及 *bHLH38* 和 *FIT* 双过表达都可以促进 *IRT1*，*FRO2* 和内源 *FIT* 的转录。相比较，在-Fe 情况下，双过表达促进了 *IRT1* 和 *FRO2* 的表达，但没有促进 *FIT* 的表达，而 *bHLH38* 单过表达对 *IRT1*，*FRO2* 和 *FIT* 表达的影响不大。因此，我们得出结论：bHLH Ib 是缺铁诱导 *FIT* 的必要条件，而不是充分条件。

当外源 FIT 蛋白过量表达时，拟南芥会启动体内的 26S 蛋白酶降解系统来促进 FIT 的降解，最终维持 FIT 的蛋白相对稳定（Meiser et al., 2011; Sivitz et al., 2011）。研究人员认为，在-Fe 条件下，拟南芥植物需要维持稳定水平的、有活性的 FIT 蛋白，即可以保证植物吸收足够的铁，又可以保证植物不会因吸入过多铁而产生毒害（Sivitz et al., 2011）。我们的数据表明，*FIT* 转录水平在缺铁条件下已经达到了最高值，即便额外增加正调控它的转录因子的水平也不能再提高 *FIT* 的转录水平，这暗示植物不需要或不能维持太高的内源 *FIT* 转录本。这种内源 *FIT* 转录本的阈值现象与 FIT 蛋白的阈值现象非常类似。我们猜测，植物可能已经进化出了不同的方式来为维持铁稳态。从 RNA 和蛋白两方面控制 FIT 的水平可能是植物维持铁稳态的关键一环。除了这两方面，拟南芥还能根据铁浓度的变化调整 FIT 蛋白在细胞核与细胞质的比例，以及调整 FIT 的磷酸化状态（Gratz et al., 2019，2020），最终维持植物的铁稳态。该研究从 RNA 角度分析研究了 *FIT* 的转录变化，这为我们深入了解植物通过多种途径共同维持铁稳态提供了新的见解。

参考文献：

BALK J, SCHAEDLER TA, 2014. Iron cofactor assembly in plants [J]. Ann Rev Plant Biol, 65: 125–153.

BUCKHOUT TJ, YANG TJW, SCHMIDT W, 2009. Early iron-deficiency-induced transcriptional changes in Arabidopsis roots as revealed by microarray analyses [J]. BMC Genomics, 10: 147.

CAI Y, LI Y, LIANG G, 2021. FIT and bHLH Ib transcription factors modulate iron and copper crosstalk in Arabidopsis [J]. Plant Cell Environ, 44(5): 1679-1691.

COLANGELO EP, GUERINOT ML, 2004. The essential basic helix–loop–helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response [J]. Plant Cell, 16(12): 3400–3412.

CUI Y, CHEN CL, CUI M, et al., 2018. Four IVa bHLH transcription factors are novel interactors of FIT and mediate JA inhibition of iron uptake in Arabidopsis [J]. Mol Plant, 11(9): 1166-1183.

FOURCROY P, SISO-TERRAZA P, SUDRE D, et al., 2014. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency [J]. New Phytol, 201(1): 155–167.

GARCIA MJ, LUCENA C, ROMERA FJ, et al., 2010. Ethylene and nitric oxide involvement in the up-regulation of key genes related to iron acquisition and homeostasis in Arabidopsis [J]. J Exp Bot, 61(14): 3885–3899.

GRATZ R, MANISHANKAR P, IVANOV R, et al., 2019. CIPK11-Dependent phosphorylation modulates FIT activity to promote Arabidopsis iron acquisition in response to calcium signaling [J]. Dev Cell, 48(5): 726–740.

GRATZ R, BRUMBAROVA T, IVANOV R, et al., 2020. Phospho-mutant activity assays provide evidence for alternative phospho-regulation pathways of the transcription factor FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR [J]. New Phytol, 225(1): 250-267.

GRILLET L, SCHMIDT W, 2019. Iron acquisition strategies in land plants: not so different after all [J]. New Phytol, 224(1): 11-18.

GUERINOT ML, YI Y, 1994. Iron: Nutritious, noxious, and not readily available [J]. Plant Physiol, 104(3): 815-820.

HANSCH R, MENDEL RR, 2009. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl) [J]. Curr Opin Plant Biol, 12(3): 259–266.

JAKOBY M, WANG HY, REIDT W, et al., 2004. FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. FEBS Lett, 577(3): 528-534.

LINGAM S, MOHRBACHER J, BRUMBAROVA T, et al., 2011. Interaction between the bHLH transcription factor FIT and ETHYLENE INSENSITIVE3/ETHYLENE

INSENSITIVE3-LIKE1 reveals molecular linkage between the regulation of iron acquisition and ethylene signaling in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 23(5): 1815-1829.

LEI R, LI Y, CAI Y, et al., 2020. bHLH121 Functions as a Direct Link that Facilitates the Activation of FIT by bHLH IVc Transcription Factors for Maintaining Fe Homeostasis in Arabidopsis [J]. Mol Plant, 13(4): 634-649.

MARSCHNER H, ROMHELD V, 1986. Different strategies inhigher plants in mobilization and uptake of iron[J]. J Plant Nutr, 9(3): 695–713.

MATSUOKA K, FURUKAWA J, BIDADDI H, et al., 2014. Gibberellin-induced expression of Fe uptakerelated genes in Arabidopsis [J]. Plant Cell Physiol, 55(1):87–98.

MAURER F, NARANJO ARCOS MA, BAUER P, 2014. Responses of a triple mutant defective in three iron deficiency-induced Basic Helix-Loop-Helix genes of the subgroup Ib(2) to iron deficiency and salicylic acid. PLoS ONE, 9(6):e99234.

MEISER J, LINGAM S, BAUER P, et al., 2011. Posttranslational regulation of the iron deficiency basic helix-loop-helix transcription factor FIT is affected by iron and nitric oxide [J]. Plant Physiol, 157(4): 2154–2166.

MORRISSEY J, GUERINOT ML, 2009. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome [J]. Chem Rev 109(10): 4553–4567.

NARANJO-ARCOS MA, MAURER F, MEISER J, et al., 2017. Dissection of iron signaling and iron accumulation by overexpression of subgroup Ib bHLH039 protein [J]. Sci Rep, 7(1): 10911.

ROBINSON NJ, PROCTER CM, CONNOLLY EL, et al., 1999. A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils [J]. Nature, 397(6721): 694-697.

RODRIGUEZ-CELMA J, SCHMIDT W, 2013. Reduction-based iron uptake revisited: on the role of secreted iron-binding compounds [J]. Plant Signal Behav, 8(11): e26116.

ROMHELD V, MARSCHNER H, 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses [J]. Plant Physiol, 80(1): 175–180.

SANTI S, SCHMIDT W, 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in Arabidopsis roots [J]. New Phytol, 183(4): 1072-1084.

SCHMID NB, GIEHL RFH, DOLL S, et al., 2014. Feruloyl-CoA 6'-hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in Arabidopsis [J]. Plant Physiol,

164(1): 160–172.

SCHWARZ B, BAUER P, 2020. FIT, a regulatory hub for iron deficiency and stress signaling in roots, and FIT-dependent and -independent gene signatures [J]. J Exp Bot, 71(5): 1694-1705.

SIVITZ A, GRINVALDS C, BARBERON M, et al., 2011. Proteasome-mediated turnover of the transcriptional activator FIT is required for plant iron-deficiency responses [J]. Plant J, (6): 1044-1052.

SIVITZ AB, HERMAND V, CURIE C, et al., 2012. Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-independent pathway [J]. PLoS ONE, 7(9): e44843.

SIWINSKA J, SIATKOWSKA K, OIRY A, et al., 2018. Scopoletin 8-hydroxylase: a novel enzyme involved in coumarin biosynthesis and iron-deficiency responses in Arabidopsis [J]. J Exp Bot, 69(7): 1735–1748.

TSAI HH, RODRIGUEZ-CELMA J, LAN P, et al., 2018. Scopoletin 8-hydroxylase-mediated Fraxetin production is crucial for iron mobilization [J]. Plant Physiol, 177(1): 194–207.

VAROTTO C, MAIWALD D, PESARESI P, et al., 2002. The metal ion transporter IRT1 is necessary for iron homeostasis and efficient photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 31(5): 589-599.

VERT G, GROTZ N, DEALDECHAMP F, et al., 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth [J]. Plant Cell, 14(6): 1223-1233.

WALKER EL, CONNOLLY EL, 2008. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants [J]. Curr Opin Plant Biol, 11(5): 530–535.

WANG HY , KLATTE M, JAKOBY M, et al., 2007. Iron deWciency-mediated stress regulation of four subgroup Ib BHLH genes in *Arabidopsis thaliana* [J]. Planta, 226(4): 897–908.

WANG N, CUI Y, LIU Y, et al., 2013. Requirement and Functional Redundancy of Ib Subgroup bHLH Proteins for Iron Deficiency Responses and Uptake in *Arabidopsis thaliana* [J]. Mol Plant, 6(2): 503-13.

WILD M, DAVIERE JM, REGNAULT T, et al., 2016. Tissue-specific regulation of gibberellin signaling fine-tunes Arabidopsis iron-deficiency responses [J]. Dev Cell, 37(2): 190–200.

YANG JL, CHEN WW, CHEN LQ, et al., 2013. The 14-3-3 protein GENERAL REGULATORY FACTOR11 (GRF11) acts downstream of nitric oxide to regulate iron acquisition in *Arabidopsis thaliana* [J]. New Phytol, 197(3): 815–824.

YUAN Y, WUH, WANG N, et al., 2008. FIT interacts with AtbHLH38 and AtbHLH39 in regulating iron uptake gene expression for iron homeostasis in Arabidopsis [J]. Cell Res, 18(3): 385-397.

YUAN YX, ZHANG J, WANG DW, et al., 2005. AtbHLH29 of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants [J]. Cell Res, 15(8): 613-621.